

平成 21 年 5 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2006～2009
 課題番号：18200032
 研究課題名（和文）SIRNA 搭載多重型ナノ構造体の開発と 2 型糖尿病関連遺伝子群の機能解析
 研究課題名（英文）Development of in vivo gene delivery system for siRNA and genome wide screening of type-two diabetes related genes in mice and rats
 研究代表者原島 秀吉（HARASHIMA HIDEYOSHI）
 北海道大学・大学院薬学研究院・教授
 研究者番号：00183567

研究成果の概要（和文）：本研究は、肝臓、筋肉、脂肪組織などの主要標的組織において 2 型糖尿病発症の前後で遺伝子発現が変動している遺伝子群の中で、サンプリングが容易な白血球においてもその変動を反映する遺伝子群を診断用候補遺伝子として網羅的に探索した。同時に、静脈内投与により、肝臓で高い遺伝子発現を誘導できる革新的送達システムの開発に成功した。さらに、ナノ粒子が血管内皮細胞を透過する過程を定量的に評価する系を世界に先駆けて確立し、トランスサイトーシス可能ナノ粒子の探索にも成功した。

研究成果の概要（英文）：We performed genome-wide screening of type-2 diabetes related genes which can be detectable in blood cells before disease state or after disease occurred. In parallel, we succeeded in developing in vivo gene delivery system for liver. In addition, we constructed an original assay system for nano carriers to evaluate transcytosis of endothelial cells and finally succeeded in finding a selective ligand for transcytosis of nano carriers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	13,400,000	4,020,000	17,420,000
2007 年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2008 年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2009 年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
年度			
総計	36,800,000	11,040,000	47,840,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・生体材料学

キーワード：遺伝子デリバリー、エンドサイトーシス、トランスサイトーシス、多機能性エンベロープ型ナノ構造体、血管透過

1. 研究開始当初の背景

糖尿病の患者数は 2025 年までには 3 億人に達すると試算され、中でも 2 型糖尿病が全

体の 90%を占めており、有効な診断法の開発は「愁眉の急」である。現在、2 型糖尿病関連遺伝子の探索は、SNP 解析を基本とした多

型解析を中心に進められている。本研究においては、サンプリングが容易な白血球において疾病関連遺伝子の変動を反映する遺伝子群を診断用候補遺伝子として網羅的に探索することにより、「白血球を用いた2型糖尿病の遺伝子診断」への道を拓きたい。また、*in vivo* 組織選択的なデリバリーシステムの開発の重要性は世界的に認識されている。血管系を介して癌や肝臓以外の組織へ送達するシステムは現状では皆無であり、血管内皮細胞を突破して実質細胞へ送達する血管透過型送達システムは、新しい送達技術の道を拓く革新的な基盤技術となることが期待される。

2. 研究の目的

(1) DNA アレイによる候補遺伝子の網羅的探索

2型糖尿病の患者数は2025年までには3億人に達すると試算され、中でも2型糖尿病が全体の90%を占めており、有効な診断法の開発は「愁眉の急」である。現在、2型糖尿病関連遺伝子の探索は、SNP解析を基本とした多型解析を中心に進められている。本申請研究においては、サンプリングが容易な白血球の遺伝子発現変動の違いにより将来2型糖尿病の発症を予測可能な遺伝子を探索し、その遺伝子の妥当性を検証することを目的としている。この斬新な発想は糖尿病の専門家にとっては盲点であり、日本国内はもとより世界的に見ても例がない。我々は肝臓、筋肉、脂肪組織などの主要標的組織において2型糖尿病発症の前後で遺伝子発現が変動している遺伝子群の中で、白血球においてもその変動を反映する遺伝子群に着目している。白血球の遺伝子発現変動の違いによって2型糖尿病発症の予測が可能になれば、臨床応用が可能な2型糖尿病の早期遺伝子診断の道が開ける。

(2) *in vivo* 組織選択的な遺伝子デリバリーシステムの開発

①肝臓

肝臓は糖やコレステロールの生合成にかかわる臓器であり、本臓器機能の障害は生体のホメオスタシス異常を引き起こす。上記(1)に記載したDNAアレイにより探索される糖尿病関連遺伝子の機能解析を行う上で、また、糖尿病の遺伝子治療を行う上で、静脈内投与による肝臓遺伝子導入システムは極めて有用である。本項目では、多機能性エンベロー

プ型ナノ構造体(MEND)を基盤技術とし、世界最高性能静脈内投与型肝臓用遺伝子導入システムを構築することを目的とする。

②脂肪

脂肪組織は、長い間、単に体内の余分なエネルギーを中性脂肪として蓄える貯蔵庫として考えられてきたが、最近の研究で、多様なホルモンやサイトカインを分泌し、他の臓器の機能を調節する内分泌器官として機能することが明らかにされた。脂肪細胞が過剰に脂肪を蓄積した肥満の状態になると内分泌機能に異常を来し、糖尿病や高脂血症、高血圧などの生活習慣病を惹起することも報告されていることから、脂肪組織の機能を人為的に制御するシステムの開発が必要不可欠である。本研究では、脂肪組織を構成する血管内皮細胞が、他の組織とは異なる特徴を有しているとの仮説に基づき、その特徴を利用した選択的送達システムを構築することを目的として検討を行った。

③血管透過型

正常組織の血管内皮細胞は、互いに隣接する細胞間でタイトなジャンクションを形成しており、高分子ナノキャリアの血中から組織実質への輸送は著しく制限されている。従って、トランスサイトーシスによって細胞単層を透過可能なキャリアが構築できれば、血管内皮バリアの克服につながり、DDS研究の究極的な目標である血中投与を介した組織実質移行性ベクターの実現への大きなブレイクスルーとなる。本研究では、ナノ粒子のトランスサイトーシスを評価するための新規素材を用いたトランスウェルチャンバーを新規に確立するとともに、ナノ粒子への修飾によりトランスサイトーシス経路への標的化を可能とする新規ペプチドを同定することを目標とする。

3. 研究の方法

(1) DNA アレイによる候補遺伝子の網羅的探索

2型糖尿病のモデル動物を用いて、糖尿病の発症前の白血球、肝臓、脂肪組織、骨格筋からRNAを抽出した。抽出したRNAの品質をbioanalyzerでチェックした後、agilent社製のDNAマイクロアレイキットにてサンプルを調製し、各組織での遺伝子発現プロファイルを作成した。そして遺伝子発現解析ソフトであるGene Springを用いて、各組織でコントロールに比べて発現変動する遺伝子を抽

出した。

次に白血球と肝臓で共に遺伝子変動が認められた遺伝子群に関して RT-PCR によって確かに発現量に違いがみられる遺伝子群を 3 種類選択し、これらの遺伝子に対する siRNA を 4 種類設計した。そして最も効果の高い siRNA をマウス肝臓培養細胞を用いてスクリーニングし、十分なノックダウン効果が認められる配列を決定した。決定した配列を用いて、その遺伝子の機能をハイドロダイナミクス法によって siRNA を直接肝臓に導入することによって評価した。

(2) in vivo 組織選択的な遺伝子デリバリーシステムの開発

①肝臓

外来遺伝子の核移行性促進を目指して糖修飾 MEND の開発を行った。非ウイルス性遺伝子キャリアの遺伝子導入効率が低い大きな原因の一つとして、外来遺伝子の核移行性が極めて低いことが挙げられる。この障壁を突破する戦略として、核移行性シグナル (NLS) を遺伝子キャリアに修飾する方法が有用であると考えられる。エンドソーム脱出素子である GALA および核移行性素子である糖 (maltotriose) の修飾をおこなった。

②脂肪

脂肪組織への選択的な薬物送達を実現するためには、他の組織にはない血管の特徴を利用する戦略が有効と考えられる。これまで、脂肪細胞の機能に関する研究は世界中で行われてきたが、血管内皮細胞の特徴を利用した送達システムに関する研究は皆無である。そこで、マウスの脂肪組織から血管内皮細胞を単離・培養し、脂肪血管に対する高親和性ペプチドを修飾したリポソームの取り込みを、他の組織由来の血管内皮細胞と比較することで、脂肪組織の血管内皮細胞に選択的に送達可能なナノキャリアーの構築を試みた。また、受容体に特異的な抗体等を用いて、キャリアーが血管内皮細胞に取り込まれるメカニズムについても評価を行った。

③血管透過型

トランスサイトシス研究が困難である理由の一つとして、評価系の確立が不十分であるという点が挙げられる。これまで、低分子の系細胞輸送を行うための評価系として、トランスウェルをもちいた方法が主であったが、本系を用いるには、ナノ粒子が透過できるほどの大きなポアサイズのものを用い

る必要があり、また、一方、大きなものを使用すると細胞が小孔まで詰まってしまうという問題点があった。本年度は、京都大学の田畑教授と共同でゼラチンナノファイバーシートを用いたトランスウェルを開発した。本トランスウェルチャンバーにマウス由来脳毛細血管内皮細胞を単層培養し、ファージディスプレイ法によって同定されたペプチドを修飾したリポソーム (アイソトープラベル) の上層から下層への移行を定量的に評価した。

4. 研究成果

(1) DNA アレイによる候補遺伝子の網羅的探索

2 型糖尿病発症前においては絶食時の血糖値、血清中インスリン量、体重に有意な差は認められず、2 型糖尿病の発症を予測するためには新しい診断方法が必要であることが示唆された。次に発症前の肝臓、脂肪組織、骨格筋の遺伝子発現プロファイルを作成したところ、肝臓では 503 遺伝子、脂肪組織では 1432 遺伝子、骨格筋では 314 遺伝子が発症前にもかかわらず遺伝子発現変動していることが明らかとなった。従って糖尿病感受性臓器では既に糖尿病が徐々に進行していることと、mRNA の変動は病態の進行を早期にモニター出来る指標である可能性が示唆された。そこで白血球の遺伝子発現プロファイルを作成したところ、300 遺伝子が変動しており、そのうち 4 遺伝子はインスリンシグナル伝達経路に含まれる遺伝子群であったことから、機能的に意味のある遺伝子群が変動していることが示唆された。また 300 遺伝子中、57 遺伝子が糖尿病関連組織でも変動が認められる遺伝子であったことから、これらの遺伝子群には、糖尿病の早期診断が可能な候補遺伝子であることが示唆された。

次に、白血球と糖尿病関連組織で共に遺伝子発現変動が認められる候補遺伝子群が診断用候補遺伝子となり得るか否かを検討する為に、これらの遺伝子群の中から 3 遺伝子 (Asparagine synthetase (Asns) 、 Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 3 (Gdpd3)、S100 calcium binding protein A10 (S100a10)) を選択してマウスに対する siRNA 投与による遺伝子機能解析を行った。ハイドロダイナミクス法による siRNA 投与 48 時間後に血糖値を測定した結果、全ての場合において標的 mRNA の減少と有意な血糖値の低下が認められた。従ってこれらの候補遺伝子は 2 型糖尿病と発症及び

病態進行と何らかの関連性があることが示唆された。さらに、これらの遺伝子発現変動は白血球でも検出されるため、白血球を用いた2型糖尿病の早期遺伝子診断は臨床応用出来る可能性が示唆された。

(2) in vivo 組織選択的な遺伝子デリバリーシステムの開発

①肝臓

脂質膜はカチオン性脂質 (DOTAP)、Cholesterol、TEG-Cholesterol (モル比 30:40:30) から構成し、Cholesteryl-GALA を総脂質量の 0~2 mol% 修飾した。プロタミンで凝縮化した DNA コア粒子を封入することで MEND を調製したのち、マウス尾静脈から投与し、投与 6 時間後の肝臓における遺伝子発現活性を測定した。その結果、DOTAP、DOTMA、それぞれをベースとした MEND において GALA の修飾率に依存して遺伝子発現の有意な上昇が認められた。

さらに、脂質膜を [3H] 標識した MEND をマウス尾静脈から投与し、投与 6 時間後の肝臓への移行量を測定したところ、これらの MEND における肝臓移行量にはほとんど差が認められず、遺伝子発現活性を肝臓移行量で除することで肝臓移行量当たりの遺伝子発現活性を求めたところ、GALA 修飾により顕著に上昇することが明らかとなった。以上のことから、GALA 修飾により MEND の細胞内動態が改善された結果、遺伝子発現の大きな上昇につながったことが示唆された。また、糖を MEND に修飾することにより、組織によって遺伝子発現の大きな促進も認められ、糖修飾により細胞内動態の観点から組織選択性を示すことが可能であることが示唆された。

②脂肪

C57BL/6J マウス (雄) の脂肪組織をコラゲナーゼで消化し、遠心分離によって得られた間質-血管画分から、血管内皮細胞の表面マーカーである CD31、CD102 およびレクチンを指標にして、血管内皮細胞を高純度かつ高効率に単離することに成功した。

次に、脂肪組織の血管に対して高い親和性を示すペプチド配列 (KGGRAKD、Nature Med. 2004, 10: 625-632) を合成し、このペプチドを修飾したリポソームを調製した。このペプチド修飾リポソームを単離した脂肪血管内皮細胞に作用させたところ、単に細胞表面に結合するだけでなく、細胞内へ取り込まれることが明らかとなった。さらに、肺や脳など脂

肪組織以外の組織に由来する血管内皮細胞株に対しては全く取り込まれず、脂肪組織の血管内皮細胞に対して非常に高い選択性を有することが明らかとなった。

このペプチド配列は、脂肪組織の血管内皮細胞の膜表面に存在するプロヒビチンに結合することが報告されている。そこで、脂肪組織由来血管内皮細胞を抗プロヒビチン抗体で前処理した後、リポソームを作用させたところ、その取り込みはほぼ完全に阻害された。またペプチドの前処理や 4°C 環境下においても同様に取り込みが阻害されたことからペプチド修飾リポソームの脂肪血管内皮細胞への取り込みは、プロヒビチンへの選択的結合とそれに伴う受容体介在性エンドサイトーシスに依るものであることが強く示唆された。

③血管透過型

ゼラチンナノファイバーシートを用いて作製したトランスウェルチャンバーにナノサイズのリポソームを添加した結果、下層へ効率的に移行することから、本システムはナノサイズの粒子のトランスサイトーシス評価を行うための有用なツールになることが示された。本システムを用い、ファージディスプレイによって選抜された種々のペプチドを修飾したリポソームの透過性を比較した結果、Clone95 ペプチド搭載リポソームが高いトランスサイトーシス活性を有することを明らかとした。また、本ペプチドの長さ、配列などを種々改変し、同様にリポソームの透過実験を行った結果、ナノ粒子のトランスサイトーシスを誘起可能な新規コンセンサス配列を世界に先駆けて同定することに成功した。

さらに、細胞内取り込み機構を解析した結果、本粒子はカベオラにより取り込まれ、本経路を阻害することによってトランスサイトーシスも阻害されることから、本経路がトランスサイトーシスに重要な役割を果たすことを明らかとした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Masuda T, Akita H, Niikura K, Nishio T, Ukawa M, Enoto K, Danev R, Nagayama K, Ijiro K, Harashima H. Envelope-type lipid nanoparticles incorporating a short PEG-lipid conjugate for improved control of intracellular

- trafficking and transgene transcription. *Biomaterials*. 30(27):4806-14 (2009) (査読有)
2. El-Sayed A, Masuda T, Khalil I, Akita H, Harashima H. Enhanced gene expression by a novel stearylated INF7 peptide derivative through fusion independent endosomal escape. *J Control Release*. 138(2):160-7 (2009) (査読有)
 3. H. Akita, A. Kudo, A. Minoura, M. Yamaguchi, I. A Khalil, R. Moriguchi, T. Masuda, R. Danev, K. Nagayama, K. Kogure and H. Harashima. Multi-layered nano particles for penetrating the endosome and nuclear membrane via a step-wise membrane fusion process. *Biomaterials* 30(15): 2940-9 (2009) (査読有)
 4. A. El-Sayed, IA. Khalil, K. Kogure, S. Futaki, H. Harashima. Octaarginine- and octalysine-modified nanoparticles have different modes of endosomal escape. *J Biol Chem*. 283(34):23450-61 (2008). (査読有)
 5. K. Sasaki, S. Chaki, Y. Nakamura, K. Kogure, H. Hamada, M. Ueno, S. Futaki and H. Harashima. An artificial virus-like nano carrier system: Enhanced endosomal escape of nano-particles via synergistic action of pH-sensitive fusogenic peptide derivatives. *Anal Bioanal Chem*. 391(8):2717-27 (2008). (査読有)
 6. D. Mudhakir, H. Akita, E. Tan, H. Harashima. A novel IRQ ligand-modified nano-carrier targeted to a unique pathway of caveolar endocytic pathway. *J Control Release*. 125(2): 164-173 (2008) (査読有)
 7. Y. Nakamura, K. Kogure, S. Futaki and H. Harashima. Octaarginine-modified multifunctional envelope-type nano device for siRNA. *J. Cont. Rel*. 119(3): 360-7 (2007). (査読有)
 8. Y. Hayashi, S. Iida, Y. Sato, A. Nakaya, A. Sawada, N. Kaji, H. Kamiya, Y. Baba, and H. Harashima. DNA microarray analysis on type 2 diabetes-related genes co-regulated between white blood cells and liver of diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Biol. Pharm. Bull.* 30(4): 763-771 (2007). (査読有)
 9. S. Iida, Y. Sato, A. Nakaya, Y. Shinohara, Y. Hayashi, A. Sawada, H. Nagata, N. Kaji, H. Kamiya, Y. Baba, H. Harashima. Genome wide expression analysis of white blood cells

and liver of pre-diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats using a cDNA microarray. *Biol. Pharm. Bull.* 29(12): 2451-9 (2006). (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

国際

1. 原島秀吉「多機能性エンベロープ型ナノ構造体による人工遺伝子デリバリーシステムの創製」、第 23 回日本 DDS 学会 永井賞受賞講演、2007 年 6 月 15 日、熊本 (invited)
2. H. Harashima "Controlled Intracellular Trafficking of Non-viral Vector", The 10th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy: Education Session: Topical Review: Non-viral Vector Design and Efficacy, 2007 年 5 月 30 日, Seattle, Washington, USA
3. 原島秀吉「多機能性エンベロープ型人工遺伝子デリバリーシステムの創製」、日本薬学会第 127 年会 (学術振興賞受賞講演)、2007 年 3 月 29 日、富山(invited)
4. H. Harashima "Multifunctional envelope type nano device for non-viral gene delivery: Concept and application of Programmed Packaging", 13th International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems, 2007 年 2 月 26-28 日, Salt Lake City, Utah, USA. (invited)
5. H. Harashima "Multifunctional envelope-type Nano Device for in vivo systemic delivery of siRNA", 68th International Congress of FIP, 2008 年 9 月 2 日, Basel, Switzerland (invited)
6. H. Harashima "Multifunctional envelope-type nano device for non-viral gene delivery: Concept and application for nanomedicine", Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2009, 2009 年 10 月 17 日, Hakata, Japan (invited)

[産業財産権]

出願状況 (計 9 件)

名称：脂質膜構造体に細胞透過能を付与するペプチドと結合した脂質を構成脂質として含む、細胞透過能を有する脂質膜構造体
 発明者：原島秀吉、秋田英万、藤原孝博
 権利者：北海道大学
 種類：特願
 番号：特願 2009-283091
 出願年月日：2009 年 12 月 14 日
 国内外の別：国内

名称：高分子化合物またはその複合体の細胞透過性評価装置及びその細胞透過性評価方法

発明者：原島秀吉、秋田英万、藤原孝博、田畑泰彦

権利者：北海道大学、京都大学

種類：特願

番号：特願 2009-275877

出願年月日：2009年12月3日

国内外の別：国内

名称：生体内で機能する核輸送性脂質膜構造体

発明者：原島秀吉、増田智也、秋田英万、西尾崇、新倉謙一、居城邦治

権利者：北海道大学

種類：特願

番号：特願 2009-069438

出願年月日：2009年3月23日

国内外の別：国内

名称：脂質膜構造体

発明者：原島秀吉、増田智也、秋田英万、石原一彦、金野智浩

権利者：北海道大学

種類：特願

番号：特願 2009-069438

出願年月日：2008年12月12日

国内外の別：国内

名称：オリゴアルキレングリコール修飾された脂質膜構造体

発明者：原島秀吉、増田智也、秋田英万、居城邦治、新倉謙一、西尾崇

権利者：北海道大学

種類：特願

番号：特願 2008-115388

出願年月日：2008年4月25日

国内外の別：国内

名称：リポソーム用生体成分抵抗性増強剤及びこれにより修飾されたリポソーム

発明者：原島秀吉、小暮健太朗、秋田英万、岩朝亮忠、中村宣央、二木史朗

権利者：北海道大学、京都大学、塩野義製薬

種類：PCT

番号：PCT/JP2008/000372

出願年月日：2008年2月27日

国内外の別：国外

名称：2型糖尿病診断剤

発明者：原島秀吉、飯田慎也、紙谷浩之、林泰弘、馬場嘉信

権利者：北海道大学、名古屋大学

種類：特願

番号：特願 2007-72563

出願年月日：2007年3月20日

国内外の別：国内

名称：目的物質を核内又は細胞内に送達するためのベクター

発明者：秋田英万、工藤亜沙子、原島秀吉

権利者：北海道大学

種類：PCT

番号：PCT/JP2006/319601

出願年月日：2006年9月29日

国内外の別：国外

6. 研究組織

(1)研究代表者

原島 秀吉 (HARASHIMA HIDEYOSHI)

北海道大学大学院薬学研究院：教授

研究者番号：00183567

(2)研究分担者

紙谷 浩之(KAMIYA HIROYUKI)

北海道大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：10204629

山田 勇磨 (YAMADA YUMA)

北海道大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：60451431

馬場嘉信(BABA YOSHINOBU)

名古屋大学大学院工学研究科・教授

研究者番号：30183916

(3)連携研究者

なし